

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16917

研究課題名(和文) 抗heat shock protein抗体による血液脳関門破綻の病態解明と応用

研究課題名(英文) Identification of novel autoantibody for heat shock protein disrupting the blood-brain barrier and its clinical application.

研究代表者

前田 敏彦 (Maeda, Toshihiko)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50738961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：視神経脊髄炎患者検体から、脳血管内皮細胞表面の抗原を標的とし、血液脳関門(BBB)を破綻させる新たな自己抗体の同定と機能解析を行った。ある熱ショック蛋白質に対する抗体が血液脳関門破綻をきたす新たな自己抗体となる可能性が明らかとなった。本抗体はインビトロBBBモデルのバリア機能を低下させ、本抗体価は視神経脊髄炎の発症、再発時に高値となり、重症度に関連することが明らかとなった。本抗体は視神経脊髄炎の病勢をモニターできる分子マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、視神経脊髄炎の流血中や脳脊髄液中の熱ショック蛋白質に対する自己抗体が血液脳関門の破綻に直接関与すること、および本抗体価が疾患の病勢を反映することを初めて明らかにした。熱ショック蛋白質に対する抗体は、病勢をモニターする分子マーカーとなる可能性があり、本抗体の作用を人為的に阻止する新たな治療標的として有望である。

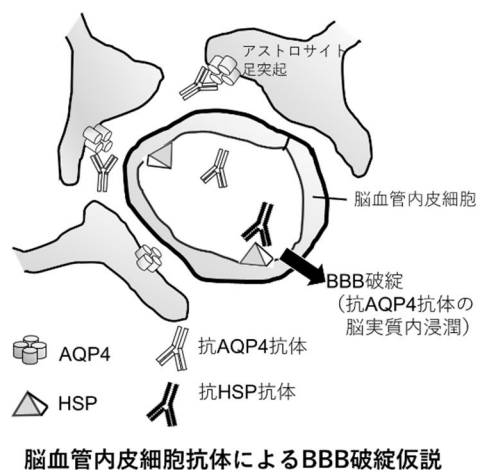
研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to discover the new autoantibody, which cause the blood-brain barrier (BBB) disruption from patients with neuromyelitis optica (NMO) using our human in vitro BBB model. We discovered new antibodies that target a heat shock protein on the surface of cerebral vascular endothelial cells which decreased the barrier function of the in vitro BBB model and its titer was found to be elevated at the onset and recurrence of NMO, and was associated with the severity of the disease. Assessment of antibody titer to this heat shock protein in NMO patients may be useful as a molecular marker to monitor the disease course of NMO.

研究分野：臨床神経学

キーワード：血液脳関門 ストレス蛋白質 視神経脊髄炎

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) や視神経脊髄炎 (neuromyelitis optica: NMO) は中枢神経組織の特異抗原に対する自己免疫機序を介した炎症性疾患であるが、発症・再発や重症度をより早期に正確に検知できる分子マーカーは現在までなく、発症・再発を早期にモニターできる分子マーカーの開発が望まれている。中枢神経系には、流血中と組織を隔てるバリアが存在し、血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) と呼ばれる。発症・再発時には BBB の破綻により、炎症細胞や自己抗体が組織内へ侵入することが最初の key step であり、BBB 破綻に関わる分子は、病勢をモニターする分子マーカーとしてだけでなく、治療標的として有望なターゲットになると考えられる。我々の研究室では、免疫性神経疾患でみられる BBB 破綻において、液性因子が関与する可能性を想定し、脳血管内皮細胞に作用する自己抗体の存在について探索を行い、新たな知見として熱ショック蛋白質である HSP (heat shock protein)70 family に属し、通常は小胞体中存在して分子シャペロンとして機能する GRP (Glucose-regulated protein)78 に対する自己抗体が、NMO の脳脊髄液中で増加し、脳血管内皮細胞表面に移動した内在性 GRP78 との結合を介して BBB 破綻を生じるといふ、新たな知見を報告した (Shimizu, Sci Transl Med 2017)。本研究では、その他の熱ショック蛋白質に着目し、NMO 患者の血清中に抗 GRP78 抗体の他にも、HSP をターゲットとする抗血管内皮細胞抗体が存在するかを明らかにするために検討をおこなった。



2. 研究の目的

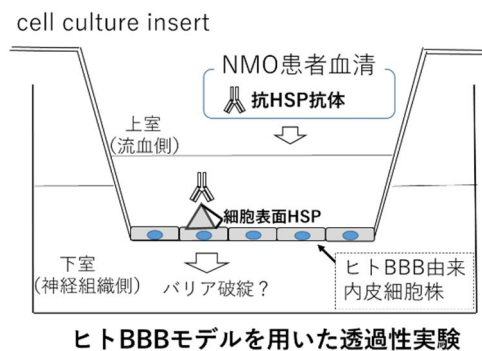
本研究の目的は、視神経脊髄炎の血液脳関門の破綻メカニズムに、新たな熱ショック蛋白質に対する自己抗体を介した機序が関与するかを解明し、視神経脊髄炎において、熱ショック蛋白質に対する自己抗体が発症・再発や重症度の分子マーカーとなりえるかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

視神経脊髄炎の血液脳関門 (BBB) の破綻メカニズムに、熱ショック蛋白質 (HSP) に対する自己抗体を介した機序が関与するか？

視神経脊髄炎患者血清と脳血管内皮細胞表面蛋白との免疫沈降法・質量分析によって、脳血管内皮細胞表面の抗原をターゲットする NMO 患者にのみ存在する脳血管内皮細胞抗体を単離・同定する。

上記方法により候補抗原の 1 つと考えられたある HSP に対する自己抗体 (抗 HSP 抗体) が、バリア構成内皮細胞表面に表出した内在性の HSP に結合しバリアを破綻させる機序を想定し、セルカルチャーインサートに脳血管内皮細胞株を単層培養して作成した、ヒト BBB モデルを用いて実験的検討を行う。視神経脊髄炎のプール血清から精製した免疫グロブリン G と、免疫沈降・質量分析によって同定された HSP 分子の全長組み換え蛋白質を用いて吸収した免疫グロブリン G のそれぞれをヒト血液脳関門モデルに作用させ、バリア機能を比較検討する。患者免疫グロブリンと、そこから抗 HSP 抗体を枯渇させた免疫グロブリンを内皮細胞に作用させた場合とでバリア機能を比較することで、抗 HSP 抗体がバリア機能低下に関わるかを評価できる。バリア機能としては、アルブミンと IgG の透過性および、電気抵抗値を測定する。また、バリア機能を担うタイトジャンクション分子を免疫染色および、ウエスタンブロット法により定量評価する。



熱ショック蛋白質に対する自己抗体が発症・再発や重症度の分子マーカーと成り得るか？ 視神経脊髄炎患者および健常対照から採取、保存した血清・髄液検体について、ELISA法を用いて抗HSP抗体の濃度を測定し、臨床像との関連性を明らかにする。臨床パラメータとしては、病勢を反映するNMOの重症度(EDSS)や、BBB破綻のパラメータであるMRI造影効果の有無、髄液所見のデータを収集する。抗HSP抗体の血中・脳脊髄液中の濃度と、NMOの重症度やBBB破綻のパラメータとの関連について明らかにすることにより、HSPに対する抗体価が重症度やバリア破綻などの臨床像と関連するかを明らかにする。

4. 研究成果

2019年度は視神経脊髄炎患者のプール血清と培養脳血管内皮細胞由来の膜蛋白質を用いた免疫沈降・質量分析法によって、脳血管内皮細胞表面の抗原を標的とする自己抗体の単離・同定と機能解析を行った。30kDaから110kDaの範囲に複数の分子量の免疫沈降産物が得られ、そのうちストレス蛋白質(HSP)分子が含まれていた。視神経脊髄炎のプール血清から精製した免疫グロブリンGと、免疫沈降・質量分析によって同定された分子の全長組み換え蛋白質を用いて吸収した免疫グロブリンGのそれぞれをヒト血液脳関門モデルに作用させ、バリア機能を比較検討した。あるストレス蛋白質の組み換え蛋白質で吸収後の免疫グロブリンGは、精製免疫グロブリンGに比べ、有意にバリア機能を改善させることが示され、HSP抗体は血液脳関門の破綻に関与する機能を持った新たな自己抗体であることが示唆された。

2020年度はHSPをターゲットとする新規自己抗体の分子マーカーとしての臨床的意義を明らかにするために、HSP抗体の血清・髄液中の測定系をELISA法を用いて構築し、自己抗体濃度と発症・再発イベントとの関係や疾患重症度などの臨床像との関連性について検討した。血清抗体価は安定期に比べ、発症時・再発時に高い傾向が認められた。また、血液脳関門の破綻の指標である髄液中蛋白濃度およびアルブミン濃度と髄液中の自己抗体価が関連する傾向がみられた。新規自己抗原に対する抗体価は発症・再発イベント、発症・再発時の重症度および血液脳関門破綻の病態にと自己抗体価が関連する傾向がみられた。

2021年度は脳血管内皮細胞をターゲットとする新規自己抗体による血液脳関門の破綻機序をさらに検討するため、ヒト血液脳関門モデルを用いて実験的検討を行った。視神経脊髄炎のプール血清から精製した免疫グロブリンGと、同定された新規ターゲット分子の全長組み換え蛋白質を用いて吸収した免疫グロブリンGを、それぞれヒト脳血管内皮細胞に作用させ、血液脳関門のバリア機能維持に重要なタイトジャンクション分子であるclaudin-5の発現をウエスタンブロット法および免疫染色法で比較した。患者血清から精製した免疫グロブリンGに比べ、ターゲット分子の組み換え蛋白質で吸収後の免疫グロブリンGは、脳血管内皮細胞のclaudin-5の蛋白量を有意に増加させた。

一連の検討で、ある熱ショック蛋白質に対する抗体は、血液脳関門の破綻に直接関与する新たな自己抗体であり、その抗体価は、発症、再発時に高値で、重症度に関連性が認められ、視神経脊髄炎の病勢をモニターできる分子マーカーとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maeda Toshihiko, Kawai Motoharu, Ishiguchi Eri, Omoto Masatoshi, Ogasawara Jun-ichi, Kanda Takashi	4. 巻 60
2. 論文標題 Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy with myelopathy due to massively enlarged nerve roots	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rinsho Shinkeigaku	6. 最初と最後の頁 603 ~ 608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5692/clinicalneuro1.cn-001416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sano Hironori, Maeda Toshihiko, Sato Ryota, Shimizu Fumitaka, Koga Michiaki, Kanda Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Acute sarcoid myopathy and neuropathy aggravated by ustekinumab administration in an elderly woman with psoriasis and systemic sarcoidosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rinsho Shinkeigaku	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5692/clinicalneuro1.cn-001714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishiguchi Eri, Sano Yasuteru, Maeda Toshihiko, Shimizu Fumitaka, Fujisawa Miwako, Honda Masaya, Takeshita Yukio, Koga Michiaki, Kanda Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Glial cell line derived neurotrophic factor and basic fibroblast growth factor derived from skeletal muscle pericytes increase the barrier function of endothelial cells in the endomysium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 258 ~ 267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cen3.12674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Toshihiko Maeda, Masatoshi Omoto.
2. 発表標題 Myeloperoxidase induces blood-brain barrier dysfunction in aquaporin 4-positive NMO/MS
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshihiko Maeda , Yasuteru Sano, Fumitaka Shimizu, Yukio Takeshita, Susumu Fujikawa, Takashi Kanda.
2. 発表標題 Autocrine MMP-9 secretion disrupt the blood-nerve barrier in typical CIDP.
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masatoshi Omoto, Toshihiko Maeda, Takashi Kanda
2. 発表標題 Historical investigation of necroptosis in anti-SRP myopathy
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuteru Sano, Toshihiko Maeda , Fumitaka Shimizu, Yukio Takeshita, Takashi Kanda
2. 発表標題 The role of activated vitamin D for the barrier function of the endomysial endothelium
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masatoshi Omoto, Toshihiko Maeda, Takashi Kanda
2. 発表標題 Histological investigation of VEGF expression in the BNB in CIDP
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------